

(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

EP 1 008 350 A1

(12)

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:

14.06.2000 Patentblatt 2000/24

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>: A61K 35/16

(21) Anmeldenummer: 99122673.9

(22) Anmeldetag: 15.11.1999

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU  
MC NL PT SE

Benannte Erstreckungsstaaten:

AL LT LV MK RO SI

(30) Priorität: 08.12.1998 DE 19856443

(71) Anmelder:

Aventis Behring Gesellschaft mit beschränkter  
Haftung  
35002 Marburg (DE)

(72) Erfinder:

- Römisch, Jürgen Dr.  
35041 Marburg (DE)
- Stauss, Harald  
35232 Dautphetal (DE)

(54) **Stabilisiertes Antithrombin III-Präparat**

(57) Es wird ein stabilisiertes Antithrombin III-Präparat beschrieben, das gegen einen Wirkungsverlust bei der Pasteurisierung durch den Zusatz von Stabilisatoren geschützt ist, welche aus einem oder mehreren Sacchariden in Mischung mit mehr als 0,5 mol/l einer oder mehrerer Aminosäuren aus der Gruppe Arginin, Lysin, Histidin, Phenylalanin, Tryptophan, Tyrosin, Asparaginsäure und ihren Salzen oder Glutaminsäure und ihren Salzen bestehen, wobei jeder dieser Aminosäuren auch noch Glycin oder Glutamin zugesetzt sein kann.

EP 1 008 350 A1

## Beschreibung

[0001] Gegenstand der Erfindung ist ein stabilisiertes Antithrombin III-Präparat, das durch den Zusatz von Stabilisatoren gegen einen Wirkungsverlust bei der Pasteurisierung geschützt ist sowie ein Verfahren zur Virusinaktivierung eines derartigen Antithrombin III-Präparats.

[0002] Antithrombin III (ATIII) ist einer der wichtigsten plasmatischen Inhibitoren. ATIII gehört zu der Familie der Serinprotease-Inhibitoren, die mit ihren "Zielproteasen" einen der kovalenten Bindung nahe kommenden Komplex eingehen. Dieser Komplex ist unter physiologischen Bedingungen sehr stabil und wird in der Regel schnell aus dem Blutkreislauf eliminiert. Die Reaktion zwischen ATIII und der Protease wird durch Heparin drastisch beschleunigt, wobei das ATIII nach Assoziation mit dem Glykosaminoglykan eine leichte Konformationsänderung erfährt und damit eine beschleunigte Reaktion mit der Protease eingehen kann. Diese Vorgänge spielen physiologisch besonders an Zelloberflächen eine Rolle, die Glykosaminoglykane z.B. vom Typ des Heparansulfates enthalten und somit eine Barriere der Zellen und Gewebe vor überhöhter proteolytischer Aktivität darstellen. Daneben kommt aber auch der plasmatischen Gerinnung und deren Regulation eine wichtige Bedeutung zu.

[0003] Besonders deutlich wird die regulatorische Funktion dieses Inhibitors, wenn die ATIII Plasmaspiegel sinken, wie es bei vielen Krankheiten und besonders drastisch z.B. im Falle einer disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC) beobachtet wird. Bereits ein Unterschreiten von 70% der entsprechenden Plasmakonzentration ist mit einer drastischen Erhöhung der Mortalitätswahrscheinlichkeit verbunden. Ein Überwiegen von Gerinnungsprozessen führt häufig zu thrombotischen Verschlüssen von Gefäßen und damit zum Organversagen. Entsprechend hat sich die Applikation von ATIII-Konzentraten aus humanem Plasma besonders in Fällen von angeborenen and erworbenen Mangelzuständen als sehr hilfreich erwiesen.

[0004] Patienten, die an einem angeborenen oder erworbenen ATIII-Mangel leiden, werden derzeit durch Substitution von aus Humanplasma gewonnenen Konzentraten therapiert. Neben der Effektivität dieser Konzentrate muß besonders die Sicherheit hinsichtlich des potentiellen Risikos einer Übertragung von Infektionskrankheiten gewährleistet sein. Neben Virusinaktivierungsverfahren, wie der Behandlung mit Detergenzien z.B. nach der SD (solvent/detergent)-Methode kommt dafür auch die als Pasteurisierung bekannte Hitze-Inaktivierung von Viren bei 60°C in Betracht, die bereits in den 40er Jahren für Albumin angewendet wurde. Im Allgemeinen werden bei einer Pasteurisierung Proteine bis zu 10 Stunden bei 60°C behandelt. Diese hohe Temperatur kann aber zu Denaturierungen der Proteine führen, die Verluste der Wirksamkeit und der Ausbeute zur Folge haben. Beim ATIII spiegelt sich dies in dem Verlust der heparinbindenden Eigenschaften eines bestimmten Proteinanteiles wider. Dieser ATIII-Anteil ist nicht mehr in einem Heparin-Kofaktortest meßbar und zeigt sich in der zweidimensionalen Immunelektrophorese als separater Peak, der eindeutig von dem Heparin-bindenden Anteil unterscheidbar ist.

[0005] Den meist auf konformationellen Veränderungen der Proteine zurückzuführenden Veränderungen wird durch Zugabe von Stabilisatoren zu der zu erhitzenden Lösung entgegengewirkt. Zur Erzielung eines optimalen Schutzes derartiger Proteine müssen die hierfür eingesetzten Stabilisatoren sowohl in ihrer Zusammensetzung als auch in den mengenmäßigen Anteilen der einzelnen Bestandteile des Stabilisatorgemisches genau auf jedes Protein abgestimmt sein. Dementsprechend ist aus der US-Patentschrift 4 297 344 ein spezielles Stabilisatorgemisch für ATIII bekannt, das bei Pasteurisierungsverfahren angewendet wird. Dabei wird ATIII in wäßriger Lösung mit einem Kohlenhydrat wie Saccharose und mindestens einer Aminosäure aus der Reihe Glycin,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Alanin, Hydroxy-Prolin, Glutamin und  $\alpha$ - ,  $\beta$ - oder  $\gamma$ -Buttersäure versetzt. Damit läßt sich jedoch keine vollständig befriedigende Stabilisierung von ATIII erreichen, da nach der Pasteurisierung der Heparin nicht- bindende Anteil über 12% liegt.

[0006] Es wurde nun gefunden, daß ATIII gegen einen Wirkungsverlust bei der Pasteurisierung wesentlich effektiver geschützt werden kann, wenn als Stabilisatoren entweder ein oder mehrere Saccharide in erhöhter Konzentration ( $> 1$  g/ml) oder ein oder mehrere Saccharide in Kombination mit einer oder mehreren Aminosäuren aus der Gruppe Arginin, Lysin, Histidin, Phenylalanin, Tryptophan, Tyrosin, Asparaginsäure und ihren Salzen sowie Glutaminsäure und ihren Salzen ausgewählt werden. Dabei kann eine oder mehrere dieser Aminosäuren auch mit Glycin und/oder Glutamin kombiniert werden.

[0007] Die Stabilisatoren werden normalerweise in einer Pufferlösung, z.B. einer Citratlösung, eingesetzt.

[0008] Als Saccharid kann ein Monosaccharid, ein Disaccharid oder ein Oligosaccharid in einer Menge von wenigstens 0,5 g/ml eingesetzt werden. Bevorzugt ist jedoch ein Wert über 1,0 g/ml, wobei gleichzeitig pH-Werte von 6,0 bis 9,5, bevorzugt von 7,0 bis 8,5 angewendet werden.

[0009] Die vorstehend genannten Aminosäuren werden allein oder in Kombination in einer Menge von wenigstens 0,1 mol/l, vorzugsweise jedoch in einer Menge von mehr als 0,5 mol/l eingesetzt. Besonders bevorzugt werden dabei Kombinationen von einem oder mehreren Zuckern in einer Konzentration von mehr als 1,5 g/ml und einer oder mehreren Aminosäuren in Konzentrationen von jeweils mehr als 0,1 mol/l. Ebenfalls besonders bevorzugt ist die Kombination von einem Zucker in einer Menge von mehr als 1,5 g/ml und einer oder mehreren der obengenannten Aminosäuren mit Glycin und/oder Glutamin, die alle jeweils in Konzentrationen von über 0,2 mol/l zur Anwendung kommen sollten. Ammoniumsulfat kann in Kombination mit den obengenannten Stabilisatoren bis zu einer Endkonzentration von 15%

zugesetzt werden.

[0010] Die so stabilisierte Lösung des ATIII wird zur Virusinaktivierung 5 bis 50 Stunden, bevorzugt 8 bis 20 Stunden, bei 40 bis 95°C, bevorzugt bei 50 bis 70°C erhitzt. Am günstigsten ist jedoch eine Virusinaktivierung bei 55 bis 65°C.

[0011] Die Herstellungsverfahren für das ATIII-Konzentrat, wie chromatographische Verfahren mittels immobilisierten Heparins sind dem Fachmann bekannt. Das erfindungsgemäße Verfahren zur Virusinaktivierung wird im allgemeinen auf aus Plasma gewonnenes ATIII angewendet und ist unabhängig von der Plasmafraktion, die als Ausgangsprodukt für die weitere Reinigung des ATIII gewählt wird. Die Erfindung kann ebenso auch auf rekombinant hergestelltes oder transgenes ATIII angewendet werden.

[0012] Die beschriebene Stabilisierung kann auch bei anderen Virusinaktivierungsverfahren angewendet werden.

[0013] Die Erfindung wird an folgenden Beispielen erläutert:

#### Beispiel 1

[0014] Jeweils 5 bis 10 ml einer Lösung, die ATIII in einer Konzentration von etwa 200 IU/ml enthielt, wurden mit Saccharose allein und in Kombination mit einer oder mehreren Aminosäuren versetzt und für 10 Stunden bei 60°C inkubiert. Anschließend wurde die Nativität des ATIII im Sinne der Heparin-bindenden Eigenschaften durch zweidimensionale Immunelektrophorese bestimmt. Dazu wurde eine Elektrophorese der Proteinlösung in Gegenwart von Heparin durchgeführt. Die Heparin-bindenden Moleküle wurden dadurch stärker negativ geladen und wanderten entsprechend schneller im elektrischen Feld. Danach wurde ein Agarosegel unter Zugabe eines polyklonalen Antikörpers gegen ATIII an das erste Gel angegossen und das elektrische Feld im rechten Winkel zur ersten Laufrichtung angelegt. In Bereichen äquimolarer Verhältnisse von ATIII zu Antikörper fand eine Präzipitationsreaktion statt. Nach Wässern des Geles wurde die Präzipitationslinie in Form einer Kurve bzw. eines Peaks durch Anfärbung z.B. mit Coomassie Blue deutlicher sichtbar gemacht. Eine Quantifizierung des Heparin-bindenden bzw nicht-bindenden Anteiles erfolgte nach Ziehen der Basislinie mit Hilfe eines Scanners und der Integration der Peakflächen, deren Summe gleich 100% gesetzt wurde. Die entsprechenden Peaks wurden dazu in das Verhältnis gesetzt und der entsprechende Anteil in Prozent ausgedrückt. Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei 3% Heparin-nicht-bindendem Anteil.

[0015] Es wurden jeweils mehrere Lots getestet, wobei immer die ATIII Lösung vor Pasteurisierung als Kontrolle eingeschlossen wurde.

[0016] Folgende Ansätze wurden pasteurisiert und wie beschrieben ausgewertet. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte von 2 bis 5 Lots dargestellt. Die Versuche Nr. 1, 2, 3A und 3B stellen den Stand der Technik dar. Die Versuche 4, 5, 6, 7 und 8 zeigen, daß bei einem erfindungsgemäß stabilisierten Antithrombin III-Präparat der Heparin-nicht-bindende Anteil zwischen etwa 3 und 4% liegt.

Nr.	Saccharose (g/ml)	Aminosäuren (mol/l)	Heparin nicht bindender Anteil (%)
1		vor Pasteurisierung	<3
2	0,5	---	>20
3A	1,0	Glycin (2 mol/l)	12,8
3B	1,0	Glycin (2 mol/l) (Arginin (2 mol/l)/Glutamat (2 mol/l) wurden erst nach der Pasteurisierung zugesetzt)	12,6
4	1,75	Glycin (2 mol/l)/Glutamat (2 mol/l)	< 3,5
5	1,75	Glycin (2 mol/l)/Glutamat (2 mol/l)	< 3
6	1,75	Arginin(2mol/l)	4,3
7	1,75	Lysin (2 mol/l)	3,9
8	1,75	Glutamat (1 und 2 mol/l)	< 3

#### Erg bnis:

[0017] Der jeweilige Ansatz vor Pasteurisierung (Nr. 1) enthielt erwartungsgemäß in jedem Fall <3% Heparin nicht-bindenden Anteil ATIII. Ansätze ohne bzw. sehr geringe Stabilisatormengen zeigten nach Erhitzung >20% des nicht-

bindenden Proteins (Nr. 2).

[0018] Die Mischungen mit Glycin/Glutamat (Nr. 4) mit im Mittel <3,5% und besonders mit Glycin/Glutamat/Arginin (Nr. 5) mit <3% zeigten sehr effektive stabilisierende Wirkungen. Auch die Kombinationen von Saccharose z.B. mit Arginin oder Lysin (Nr. 6,7) haben sich als vorteilhaft herausgestellt. Bereits Glutamat allein bewirkte eine sehr effektive Stabilisierung (Nr. 8).

[0019] Zur Untersuchung, ob die zugesetzten Stabilisatoren, besonders die Aminosäuren Glutamat und Arginin, allein das elektro-phoretische Laufverhalten beeinflussen, wurden diese (Nr. 3B) erst nach der Pasteurisierung dem Gemisch Saccharose/Glycin zugesetzt und mit der Kontrolle (3A) verglichen. Es wurde demonstriert, daß diese Zusätze keinen signifikanten Einfluß auf die Elektrophorese hatten.

#### Beispiel 2:

[0020] Die Abhängigkeit der Stabilisierung von der Zuckerkonzentration wurde entsprechend der Versuchsdurchführung in Beispiel 1 untersucht.

Nr.	Saccharose (g/ml)	Aminosäuren (mol/l)	Heparin nichtbindender Anteil (%)
1	vor Pasteurisierung		< 3
2	0,5	---	>20
3A	1,0	Glycin (2 mol/l)/Glutamat	6,8
3B	1,0	Glycin (2 mol/l)	12,8
3C	1,75	Glycin (2 mol/l)	5,4
4A	0,5	Glutamat (1 mol/l)/Arginin (2 mol/l)	14,1
4B	1,0	Glutamat (1 mol/l)/Arginin (2 mol/l)	6,4
4C	1,75	Glutamat (1 mol/l)/Arginin (2 mol/l)	< 3

#### Ergebnis:

[0021] Sowohl die Ansätze 3B und C als auch 4A bis C zeigen, daß die Erhöhung des Zuckeranteiles einen wichtigen Beitrag zur Stabilisierung lieferte. Der zusätzlich stabilisierende Effekt von Glutamat/Arginin (4B) oder Glutamat (3A) bzw. gegenüber den Ansätzen mit Glycin (3A versus 3B) bei einer Saccharose-Konzentration von lediglich 1 mol/l wurde ebenfalls deutlich.

#### Patentansprüche

1. Stabilisiertes Antithrombin III-Präparat, dadurch gekennzeichnet, daß es gegen einen Wirkungsverlust bei der Pasteurisierung durch den Zusatz von Stabilisatoren geschützt ist, welche aus

a) einem oder mehreren Sacchariden oder

b) einem oder mehreren Sacchariden in Kombination mit einer oder mehreren Aminosäuren aus der Gruppe Arginin, Lysin, Histidin, Phenylalanin, Tryptophan, Tyrosin, Asparaginsäure und ihre Salzen oder Glutaminsäure und ihren Salzen bestehen, wobei jeder dieser Aminosäuren auch noch Glycin und/oder Glutamin zugesetzt sein kann.

2. Stabilisiertes Antithrombin III-Präparat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es als Saccharid ein Monosaccharid, ein Disaccharid, ein Oligosaccharid in einer Menge von wenigstens 0,5 g/ml enthält.

3. Stabilisiertes Antithrombin III-Präparat nach den Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß es das Saccharid in einer Menge von mehr als 1,5 g/ml enthält.

4. Stabilisiertes Antithrombin III-Präparat nach den Ansprüchen 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß es eine oder mehrere Aminosäuren in einer Menge von wenigstens 0,1 mol/l enthält.
5. Stabilisiertes Antithrombin III-Präparat nach den Ansprüchen 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß es zusätzlich bis zu 15% Ammoniumsulfat enthält.
6. Verfahren zur Virusinaktivierung eines Antithrombin III-Präparates, **dadurch gekennzeichnet**, daß man ein stabilisiertes Antithrombin III-Präparat gemäß den Ansprüchen 1 bis 5 einer Hitzebehandlung bei 40 bis 95°C über einen Zeitraum von 5 bis 50 Stunden unterwirft.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

THIS PAGE BLANK (11/15/70)



Europäisches  
Patentamt

# EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung  
EP 99 12 2673

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.7)
D, X	EP 0 018 561 A (BEHRINGWERKE AG) 12. November 1980 (1980-11-12) * Seite 24-25; Beispiel 5 *	1, 2, 5, 6	A61K35/16
X	US 4 623 717 A (FERNANDES PETER M ET AL) 18. November 1986 (1986-11-18) * Spalte 3, Zeile 61 - Spalte 6, Zeile 54 * * Spalte 8, Zeile 1-12 * * Ansprüche 1, 4, 5 *	1-6	
X	BUSBY T F ET AL: "THERMAL STABILIZATION OF ANTITHROMBIN III BY SUGARS AND SUGAR DERIVATIVES AND THE EFFECTS OF NONENZYMATIC GLYCOSYLATION" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, NL, AMSTERDAM, Bd. 799, Nr. 1, 25. Mai 1984 (1984-05-25), Seiten 80-89, XP000674342 ISSN: 0006-3002 * das ganze Dokument *	1	
A	US 4 340 589 A (UEMURA YAHIRO ET AL) 20. Juli 1982 (1982-07-20) * das ganze Dokument *	1-6	A61K
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort <b>MÜNCHEN</b>		Abchlußdatum der Recherche <b>10. April 2000</b>	Prüfer <b>Engl, B</b>
<p>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE</p> <p>X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur</p> <p>T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument &amp; : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</p>			

EPO FORM 1503 03.82 (PM03)

THIS PAGE BLANK (USPTO)



**ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT  
ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 99 12 2673

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patentedokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am  
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

10-04-2000

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0018561 A	12-11-1980	DE 2916711 A	06-11-1980
		AT 22396 T	15-10-1986
		DK 176280 A,B,	26-10-1980
		ES 490682 D	01-12-1980
		ES 8100884 A	01-03-1981
		IL 59924 A	15-06-1983
		JP 1693440 C	17-09-1992
		JP 55145615 A	13-11-1980
		JP 62054286 B	13-11-1987
		US 4297344 A	27-10-1981
US 4623717 A	18-11-1986	AT 30296 T	15-11-1987
		CA 1187410 A	21-05-1985
		DK 98681 A,B,	06-09-1981
		EP 0035204 A	09-09-1981
		ES 500121 D	01-01-1982
		ES 8201827 A	01-04-1982
		JP 1980554 C	17-10-1995
		JP 6011702 B	16-02-1994
		JP 56139422 A	30-10-1981
		MX 6967 E	09-01-1987
US 4340589 A	20-07-1982	US 4440679 A	03-04-1984
		JP 1422481 C	29-01-1988
		JP 54095715 A	28-07-1979
		JP 59007693 B	20-02-1984
		BE 877439 A	05-11-1979
		CA 1126652 A	29-06-1982
		CH 645537 A	15-10-1984
		FR 2460138 A	23-01-1981
		GB 2064545 A,B	17-06-1981
		WO 8002798 A	24-12-1980
		NL 7905220 A,B,	06-01-1981
		SE 459784 B	07-08-1989
		SE 8101065 A	13-04-1981

EPO FORM P0481

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

### **Stabilized antithrombin III preparation**

The invention relates to a stabilized antithrombin III preparation which is protected against a loss of action during pasteurization by the addition of stabilizers, and to a process for virus inactivation of an antithrombin III preparation of this type.

Antithrombin III (ATIII) is one of the most important plasmatic inhibitors. ATIII belongs to the family of serine protease inhibitors, which with their "target proteases" enter into a complex approximating the covalent bond. This complex is very stable under physiological conditions and as a rule is rapidly eliminated from the blood circulation. The reaction between ATIII and the protease is drastically accelerated by heparin, the ATIII undergoing a slight change in conformation after association with the glycosaminoglycan and thus being able to enter into an accelerated reaction with the protease. Physiologically, these processes play a role, particularly on cell surfaces which contain glycosaminoglycans, e.g. of the heparin sulfate type, and thus represent a barrier of the cells and tissue against excessive proteolytic activity. In addition, however, plasmatic coagulation, and its regulation, is also of great importance.

The regulatory function of this inhibitor is particularly clear when the ATIII plasma levels fall, as is observed in many illnesses and particularly drastically, for example, in the case of disseminated intravascular coagulation (DIC). Even a shortfall of 70% of the corresponding plasma

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

concentration is associated with a drastic increase in the probability of mortality. A predominance of clotting processes frequently leads to thrombotic occlusions of vessels and thus to organ failure. Correspondingly, administration of ATIII concentrates from human plasma has proven very helpful, particularly in cases of inherited and acquired deficiency states.

Patients who suffer from inherited or acquired ATIII deficiency are at present treated by substitution of concentrates obtained from human plasma. In addition to the effectiveness of these concentrates, safety with respect to the potential risk of transfer of infectious diseases must particularly be guaranteed. In addition to virus inactivation processes, such as treatment with detergents, e.g. according to the SD (solvent/ detergent) method, the heat inactivation of viruses at 60°C, which has already been used in the 1940s for albumin, is also suitable for this purpose. In general, proteins are treated at 60°C for up to 10 hours during pasteurization. This high temperature, however, can lead to denaturation of the proteins, which results in losses in activity and yield. In the case of ATIII, this is reflected in the loss of the heparin-binding properties of a specific protein fraction. This ATIII fraction is no longer measurable in a heparin cofactor test and is seen in two-dimensional immunoelectrophoresis as a separate peak, which can be clearly differentiated from the heparin-binding fraction.

The changes, which can mostly be attributed to conformational changes in the protein, are counteracted by addition of stabilizers to the solution to be heated. To achieve optimum protection of proteins of this type, the stabilizers employed for this must be exactly suited to each protein both in their composition and in the quantitative proportions of the individual constituents of the stabilizer mixture. Accordingly, US Patent 4 297 344 discloses a specific stabilizer mixture for ATIII which is used in pasteurization processes. In this patent, ATIII is mixed in aqueous solution with a carbohydrate such as sucrose and at least one amino acid from the series consisting of glycine,  $\alpha$ - and  $\beta$ -alanine, hydroxyproline, glutamine

THIS PAGE BLANK (USPTO)

and  $\alpha$ -,  $\beta$ - or  $\gamma$ -butyric acid. However, completely satisfactory stabilization of ATIII cannot be thus achieved, as the heparin-nonbinding fraction is over 12% after pasteurization.

It has now been found that ATIII can be significantly more effectively protected against a loss of action during pasteurization if either one or more saccharides in a higher concentration ( $> 1$  g/ml) or one or more saccharides in combination with one or more amino acids from the group consisting of arginine, lysine, histidine, phenylalanine, tryptophan, tyrosine, aspartic acid and its salts and also glutamic acid and its salts is selected as a stabilizer. One or more of these amino acids can also be combined with glycine and/ or glutamine here.

The stabilizers are normally employed in a buffer solution, e.g. a citrate solution.

The saccharide employed can be a monosaccharide, a disaccharide or an oligosaccharide in an amount of at least 0.5 g/ml. However, a value of over 1.0 g/ml is preferred, at the same time a pH of 6.0 to 9.5, preferably of 7.0 to 8.5, being used.

The abovementioned amino acids are employed on their own or in combination in an amount of at least 0.1 mol/l, but preferably in an amount of more than 0.5 mol/l. Combinations of one or more sugars in a concentration of more than 1.5 g/ml and one or more amino acids in concentrations of more than 0.1 mol/l in each case are particularly preferred here. The combination of a sugar in an amount of more than 1.5 g/ml and one or more of the abovementioned amino acids with glycine and/or glutamine, which are all used in concentrations of over 0.2 ml in each case, is also particularly preferred. Ammonium sulfate can be added in combination with the abovementioned stabilizers up to a final concentration of 15%.

THIS PAGE BLANK (USPTO)



For virus inactivation, the solution of ATIII stabilized in this way is heated at 40 to 95°C, preferably at 50 to 70°C, for 5 to 50 hours, preferably 8 to 20 hours. However, virus inactivation at 55 to 65°C is most favorable.

The preparation processes for the ATIII concentrates, such as chromatographic processes by means of immobilized heparin, are known to the person skilled in the art. The process according to the invention for virus inactivation is in general applied to ATIII obtained from plasma and is dependent on the plasma fraction which is selected as a starting material for the further purification of the ATIII. The invention can likewise also be applied to recombinantly prepared or transgenic ATIII.

The stabilization described can also be used in other virus inactivation processes.

The invention is illustrated by the following examples:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

### Example 1

5 to 10 ml each of a solution which contained ATIII in a concentration of approximately 200 IU/ml were mixed with sucrose alone and in combination with one or more amino acids and incubated at 60°C for 10 hours. The nativity of the ATIII in the sense of the heparin-binding properties was then determined by two-dimensional immuno-electrophoresis. For this, an electrophoresis of the protein solution was carried out in the presence of heparin. The heparin-binding molecules became more strongly negatively charged as a result and migrated correspondingly more rapidly in the electrical field. An agarose gel with addition of a polyclonal antibody against ATIII was then poured onto the first gel and the electrical field was applied at a right angle to the direction of the first run. In regions of equimolar ratios of ATIII to antibody, a precipitation reaction took place. After soaking the gel, the precipitation line was rendered clearly visible in the form of a curve or of a peak by staining, for example, with Coomassie Blue. Quantification of the heparin-binding or -nonbinding fraction was carried out by drawing the base line with the aid of a scanner and integration of the peak areas, whose sum was set equal to 100%. The corresponding peaks were related to this and the appropriate fraction was expressed in percent. The detection limit of the method is 3% of heparin-nonbinding fraction.

Several lots were tested in each case, the ATIII solution before pasteurization always being included as a control.

The following batches were pasteurized and evaluated as described. The results are shown as mean values of 2 to 5 lots. Experiments Nos. 1, 2, 3A and 3B represent the prior art. Experiments 4, 5, 6, 7 and 8 show that in the case of an antithrombin III preparation stabilized according to the invention the heparin-nonbinding fraction is between approximately 3 and 4%.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

No.	Sucrose (g/ml)	Amino acids (mol/l)	Heparin- nonbinding fraction (%)
1	before pasteurization		< 3
2	0.5	...	>20
3A	1.0	glycine (2 mol/l)	12.8
3B	1.0	glycine (2 mol/l) (arginine (2 mol/l)/ glutamate (2 mol/l) were added only after pasteurization)	12.6
4	1.75	glycine (2 mol/l)/ glutamate (2 mol/l)	<3.5
5	1.75	glycine (2 mol/l)/ glutamate (2 mol/l)	< 3
6	1.75	arginine (2 mol/l)	4.3
7	1.75	lysine (2 mol/l)	3.9
8	1.75	glutamate (1 and 2 mol/l)	< 3

### Result:

As expected, the respective batch before pasteurization (No. 1) in each case contained <3% of heparin-nonbinding fraction ATIII. After heating, batches without, or with very low amounts of, stabilizer showed >20% of the nonbinding protein (No. 2).

The mixtures with glycine/glutamate (No. 4) with on average <3.5% and particularly with glycine/glutamate/ arginine (No. 5) with <3% showed very effective stabilizing actions. The combinations of sucrose, for example, with arginine or lysine (No. 6,7) have also turned out to be advantageous. Even glutamate on its own brought about very effective stabilization (No. 8).

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

To investigate whether the stabilizers added, particularly the amino acids glutamate and arginine, affected the electrophoretic running behavior on their own, these were added (No. 3B) to the sucrose/glycine mixture only after pasteurization and compared with the control (3A). It was demonstrated that these additives had no significant influence on the electrophoresis.

### Example 2:

The dependence of the stabilization on the sugar concentration was investigated according to the experimental procedure in Example 1.

No.	Sucrose (g/ml)	Amino acids (mol/l)	Heparin- nonbinding fraction (%)
1	before pasteurization		< 3
2	0.5	...	>20
3A	1.0	glycine (2 mol/l)	
		glutamate	6.8
3B	1.0	glycine (2 mol/l)	12.8
3C	1.75	glycine (2 mol/l)	5.4
4A	0.5	glutamate (1 mol/l)/ arginine (2 mol/l)	14.1
4B	1.0	glutamate (1 mol/l)/ arginine (2 mol/l)	6.4
4C	1.75	glutamate (1 mol/l) arginine (2 mol/l)	<3

### Result:

Both the batches 3B and C and also 4A to C show that the increase in the sugar content afforded an important contribution to the stabilization. The

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



additionally stabilizing effect of glutamate/arginine (4B) or glutamate (3A) or compared with the batches with glycine (3A versus 3B) at a sucrose concentration of only 1 mol/l was also clear.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

CENTEON PHARMA GMBH

1998/Z019 - Ma 1185 - C20

**Patent claims for the USA:**

1. A stabilized antithrombin III preparation which is protected against a loss of action during pasteurization by the addition of stabilizers which consist of
  - a) one or more saccharides or
  - b) one or more saccharides in combination with one or more amino acids from the group consisting of arginine, lysine, histidine, phenylalanine, tryptophan, tyrosine, aspartic acid and its salts or glutamic acid and its salts, it also being additionally possible to add glycine and/or glutamine to these amino acids.
2. The stabilized antithrombin III preparation as claimed in claim 1, which, as a saccharide, contains a monosaccharide, a disaccharide or an oligosaccharide in an amount of at least 0.5 g/ml.
3. The stabilized antithrombin III preparation as claimed in claim 1, which contains the saccharide in an amount of more than 1.5 g/ml.
4. The stabilized antithrombin III preparation as claimed in claim 1, which contains one or more amino acids in an amount of at least 0.1 mol/l.
5. The stabilized antithrombin III preparation as claimed in claim 1, which additionally contains up to 15% of ammonium sulfate.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

6. A process for virus inactivation of an antithrombin III preparation, which comprises subjecting a stabilized antithrombin III preparation as claimed in claim 1, to heat treatment at 40 to 95°C over a period of time of 5 to 50 hours.
7. The process for virus inactivation of an antithrombin III preparation, which comprises subjecting a stabilized antithrombin III preparation as claimed in claim 2, to heat treatment at 40 to 95°C over a period of time of 5 to 50 hours.
8. The process for virus inactivation of an antithrombin III preparation, which comprises subjecting a stabilized antithrombin III preparation as claimed in claim 3, to heat treatment at 40 to 95°C over a period of time of 5 to 50 hours.
9. The process for virus inactivation of an antithrombin III preparation, which comprises subjecting a stabilized antithrombin III preparation as claimed in claim 4, to heat treatment at 40 to 95°C over a period of time of 5 to 50 hours.
10. The process for virus inactivation of an antithrombin III preparation, which comprises subjecting a stabilized antithrombin III preparation as claimed in claim 5, to heat treatment at 40 to 95°C over a period of time of 5 to 50 hours.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**Abstract:**

**Stabilized antithrombin III preparation**

A stabilized antithrombin III preparation is described which is protected against a loss of action during pasteurization by the addition of stabilizers which consist of one or more saccharides in a mixture with more than 0.5 mol/l of one or more amino acids from the group consisting of arginine, lysine, histidine, phenylalanine, tryptophan, tyrosine, aspartic acid and its salts or glutamic acid and its salts, it also being possible to additionally add glycine or glutamine to each of these amino acids.

THIS PAGE BLANK (USP10)